



## 紅色光合成細菌由来光捕集複合体Iたんぱく質に関する研究

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | 下永 応博   |
| 号   | 2842  |
| 発行年 | 2001  |
| URL | <a href="http://hdl.handle.net/10097/8115">http://hdl.handle.net/10097/8115</a> |

しもなが まさひろ

氏 名 下 永 応 博

授 与 学 位 博士 (工学)

学位授与年月日 平成 14 年 3 月 25 日

学位授与の根拠法規 学位規則第 4 条第 1 項

研究科, 専攻の名称 東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻

学 位 論 文 題 目 紅色光合成細菌由来光捕集複合体 I タンパク質に関する研究

指 導 教 官 東北大学助教授 王 征宇

論 文 審 査 委 員 主査 東北大学教授 野澤 庸則 東北大学教授 西野 徳三

東北大学教授 熊谷 泉

紅色光合成細菌由来の LHI は約 16 個の同一サブユニットがリング状を形成し、1 つのサブユニットは主に 2 分子の Bacteriochlorophyll (BChl)  $\alpha$  と 1 組の  $\alpha, \beta$  膜内在性ポリペプチドにより構成される。紅色非硫黄光合成細菌 *Rhodospirillum* (*Rs.*) *rubrum* 由来の LHI に界面活性剤 *n*-Octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (OG) を加えると極大吸収波長が 873 nm から 820 nm へシフトし、さらに OG を加えることにより 820 nm のピークは 777 nm までシフトする。これらの会合状態は極大吸収波長の位置に因んでそれぞれ B873, B820, B777 と呼ばれている (Fig)。一般に、B873 は LHI 天然のリング状を維持した状態、B820 はそのサブユニット単位、B777 は 2 本のポリペプチドと色素が完全に遊離した状態であると考えられており、これらの状態変化は OG の濃度調整によりほぼ完全に可逆的である。このユニークな性質を利用して、LHI の構成要素から界面活性剤濃度の調整により自己会合を起こさせることで分光学的に天然の LHI と類似な複合体を再構成することができる。このような構成成分が少ない膜タンパク色素複合体の再構築は膜タンパクと色素の相互作用を研究する上では極めて有用なモデルとなりうるため、現在研究が盛んに行われている。しかし LHI は生体膜という極めて疎水的な環境に存在する膜内色素-タンパク複合体であることから、その疎水的な性質が結晶を形成するときの大きな障壁となり、原子レベルでの構造解析を大変困難にしている。

ことに LHI は光合成反応中心と密接に相互作用していることから LHI 単独での抽出自体が難しく、詳細なタンパク質一次構造の解析が大きく遅れている。本博士論文では 3 種の紅色光合成細菌からの LHI の抽出方法を確立し、それぞれのタンパク質について詳細な一次構造を明らかにするとともに機能との関連について研究した。

#### 非硫黄光合成細菌 *Rs. rubrum* 由来 LHI の酸化とその構造安定性への影響

*Rs. rubrum* 由来の LHI タンパクに  $\alpha$ -ポリペプチドの酸化体が付加的な成分として存在することを飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) を用いた分子量測定により見出した。この成分 ( $\alpha 2$ ) は未酸化の  $\alpha$ -ポリペプチド ( $\alpha 1$ ) に

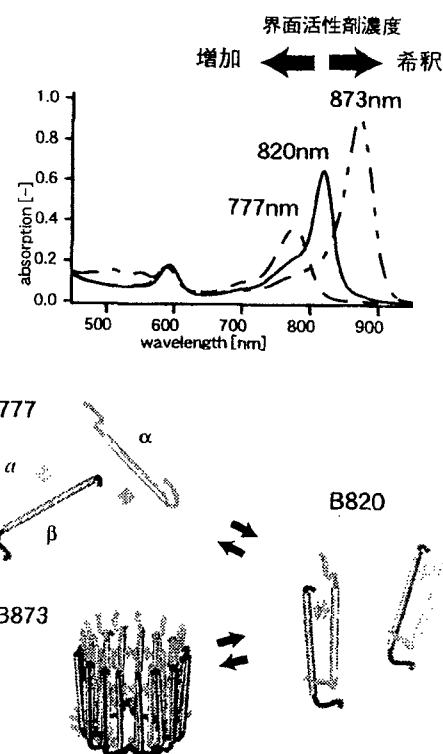


Fig. 界面活性剤濃度調整による *Rs. rubrum* 由来 LHI の会合状態変化

比べ逆相 HPLC の溶出時間が若干早い。NMR 測定により酸化部位は N 末端メチオニン残基の側鎖であることを突き止めた。 $\alpha 1$  と  $\beta$ -ポリペプチド、 $\alpha 2$  と  $\beta$ -ポリペプチドそれぞれの組み合わせを用いて再構成 B820 サブユニットを作成し、その分光学的特性を比較することで N 末端メチオニンの酸化が LHI 複合体に与える影響を調べた。その結果、メチオニンが酸化をされると明らかに再構成 B820 サブユニットの安定性が損なわれることがわかった。このことは酸化により色素結合部位の環境に影響をあたえたことを示し、 $\alpha$ -ポリペプチドの N 末端はサブユニットの構造安定性に重要であることを示唆したといえる。

#### 非硫黄光合成細菌 *Rs. rubrum* 由来 LHI $\beta$ -ポリペプチドの N 末端アミノ酸残基の決定

*Rs. rubrum* 由来の LHI  $\beta$ -ポリペプチドの質量が従来報告されていた配列から算出される分子量と異なっていることを TOF-MS を用いた分子量測定により見出した。この膜貫通ペプチド鎖を界面活性剤溶液中にてトリブシンにより断片化し、消化断片の分子量測定および種々の NMR 法を用いたタンパク質構造解析を行うことで原子レベルの詳細な一次構造を決定した。その結果、 $\beta$ -ポリペプチドの N 末端に従来の報告より 1 残基多くアミノ酸 (アラニン) が存在し、その N 末端がメチル基によって修飾されていたことを明らかにした。

#### 非硫黄および硫黄光合成細菌由来 LHI $\beta$ -ポリペプチドの N 末端のメチル化

LHI の研究の遅れている紅色硫黄光合成細菌 *Chromatium (Chr.) tepidum* と *Chr. vinosum* より高純度かつ高濃度の LHI を光捕集機能を維持した状態で精製する方法を確立し、得られた LHI の構成タンパク質の一次構造について原子レベルの詳細な解析を試みた。それぞれの LHI 構成成分を逆相 HPLC で分離した結果、*Chr. tepidum* では 3 つの溶出ピークが観測された。そのうち 2 つは  $\alpha$ -、 $\beta$ -ポリペプチドと、3 つ目の成分は N 末端にホルミル基を持つ  $\alpha$ -ポリペプチドと同定された。*Chr. vinosum* では 4 種の溶出ピークが観測され、それぞれ 2 種ずつの  $\alpha$ - と  $\beta$ -ポリペプチドと同定された。現在までに解明の進んでいる紅色光合成細菌では  $\alpha$ -、 $\beta$ -ポリペプチドがそれぞれ 1 本ずつであることから、*Chr. vinosum* は複数種の  $\alpha$ -、 $\beta$ -ポリペプチドを持つ初めての事例となった。2 菌体由来のすべての LHI 構成タンパク質の詳細な一次構造を TOF-MS と NMR を用いることで決定した。その結果、*Chr. tepidum* の  $\beta$ -ポリペプチドと *Chr. vinosum* の 2 本の  $\beta$ -ポリペプチドのうち 1 本には *Rs. rubrum* と同様に N 末端にメチル基が付加していることを見出した。本研究で見出した N 末端メチル化を受けたポリペプチドは A-X-Y-K~ (X: 負電荷を持つアミノ酸, Y: 電荷のないアミノ酸) という共通な N 末端一次構造を持つ。このことから、メチル化が起こるか否かは N 末端の一次構造に大きく依存していることが示唆された。N 末端のメチル化の検出は大変困難で、特に原核生物ではその報告例が少ないためにその生理学的役割は必ずしも明らかにならず、ポストゲノム研究対象として興味をひく発見であるといえる。

#### 硫黄光合成細菌由来 LHI のキャラクタリゼーション

これまでに様々な紅色非硫黄光合成細菌由来の LHI についての生物物理化学的性質が報告されているが、紅色硫黄光合成細菌についての知見はほとんど得られていない。そこで我々は 2 種の硫黄光合成細菌 *Chr. tepidum* と *Chr. vinosum* から単離した LHI の再構成を試み、得られた再構成体について分光学的な研究を行った。特に最適生育温度の高い菌体である *Chr. tepidum* については、LHI の耐熱構造に関しても考察を行った。それぞれの LHI について *Rs. rubrum* と同様の手法により再構成を試みた結果、*Chr. tepidum* では B820 サブユニットの再構成体を得ることができた。また、 $\alpha$ -、 $\beta$ -ポリペプチドをそれぞれ 2 本ずつ持つ *Chr. vinosum* では  $\alpha$  と  $\beta$  の組み合わせすべてにおいて B820 サブユニットと LHI 天然型の再構成体を安定に得ることができた。*Chr. tepidum* の再構成 B820 サブユニットの耐熱性を評価した結果、常温菌である *Rs. rubrum* のものとほぼ同様の挙動を示した。さらに *Chr. tepidum* の LHI  $\beta$ - ( $\alpha$ -) ポリペプチドは *Chr. tepidum* 由来の  $\alpha$ - ( $\beta$ -) ポリペプチドだけでなく、*Rs. rubrum* 由来の  $\alpha$ - ( $\beta$ -) ポリペプチドとも B820 サブユニットを再構成できることがわかった。このことは耐熱菌の LHI の構成タンパクも常温菌のものと性質が類似していることを示す。以上の知見から LHI はそれ自身が熱安定性を持つのではなく周りの環境との相互作用により熱安定性を獲得していると考えられる。次に *Chr. vinosum* の再構成 LHI の分光測定の結果、 $\alpha$ -ポリペプチドの種類により光吸収特性に明確な違いが現れることが明らかになった。この結果からサブユニットのオリゴマー化には  $\alpha$ -ポリペプチド同士の相互作用が重要であることがわかった。さらに一次構造の比較から、特に C 末端領域がオリゴマー化に強く関与していることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本学位論文は光合成器官の構造・機能解明とその応用を目指した光捕集タンパク質 I (LH1)に関するタンパク質構造および光合成色素とタンパク質の分子集合状態の構造、性質を研究したものである。資源・エネルギーの枯渇など我々を取り巻く様々な問題の解決を目指す研究の一環として光合成反応の積極的な活用方法が模索されている。このような大きな研究目標の中で、本論文は光合成明反応に必須なアンテナ色素・タンパク質などの光捕集系の諸性質とその再構築を研究した論文である。

第1章は緒論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章では、紅色非硫黄細菌*Rhodospirillum*(*Rs.*) *rubrum*由来LH1を構成するアンテナタンパク質の一次構造を詳細に検討して、 $\alpha$ -ポリペプチドを構成するペプチドのN末端メチオニンに一部酸化体が存在することを明らかにした。これらと $\beta$ -ポリペプチド、2分子のバクテリオクロロフィルとで構成されるLH1サブユニット錯体(B820)が、通常のメチオニンを有する $\alpha$ -ポリペプチドが形成するものと比較し安定性が低いことを見出し、サブユニット構造形成に対するN末端アミノ酸の寄与を示した。

第3章においては、*Rs. rubrum*由来LH1の $\beta$ -ポリペプチドの一次構造を詳細に検討した。その結果*Rs. rubrum* LH1  $\beta$ -ポリペプチドは従来報告されていた配列よりもアラニンが1残基多く、さらにそのN末端にメチル基を持つ構造であることを見出した。これは従来報告されていた $\beta$ -ポリペプチドのアミノ酸の配列が誤りであることを示すと共に、正しい配列を決定したもので重要な結果である。

第4章においては、紅色硫黄細菌*Chromatium*(*Chr.*) *tepidum*および*Chr. vinosum*におけるLH1について研究した。その結果、*Chr. tepidum*では $\beta$ -ポリペプチドが1種類、 $\alpha$ -ポリペプチドが2種類存在することを示し、 $\beta$ -ポリペプチドにおけるN末端アラニンのメチル化と $\alpha$ -ポリペプチドにおいてはN末端ホルミル基の存在するものとしらないものがあることを見出した。*Chr. vinosum*については $\alpha$ -、 $\beta$ -ポリペプチドにそれぞれ2種類を発見し、それらを同定した。

第5章においては、*Chr. tepidum*について、第4章で確定したポリペプチドの組み合わせを用いて、B820ならびにLH1錯体B915の再構築を試み、B820の再構成に成功した。

第6章では以上の研究を総括した。

以上要するに本論文では、光生物が効率的に光エネルギーの捕獲に用いているアンテナ器官の構造と特性を種々の光合成細菌のペプチド構造から解明するとともに、天然の色素およびペプチを用いた光捕集タンパク質 I (LH1)およびそのサブユニットの再構築を行い、それらの工学的応用のための新しい知見を与えたものであり、生物工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。